

## CORELAȚIA INDICILOR IMUNITĂȚII CELULARE ȘI ALE GENEI BRCA1 5382 INSC LA PACIENTELE CU CANCER MAMAR ȘI DIABET ZAHARAT TIP 2

**Diana Tcaciuc – colab. șt. stagiar,  
IMSP Institutul Oncologic**

*email [diana.tkaciuk@gmail.com](mailto:diana.tkaciuk@gmail.com) tel.serviciu 022 85 24 18*

### Rezumat

Factorul ereditar reprezintă o condiție non-modificabilă de risc pentru dezvoltarea cancerului mamar manifestând unele asociații familiale și genetice. Din punct de vedere etiopatogenetic în cancerul glandei mamare (CGM) se declanșează o cascadă întreagă de modificări imunologice, care apar sub influența unor factori triggeri, pe un fond genetic bine determinat. Se presupune că riscul crescut de apariție a CGM în caz de mutație în genele BRCA este condiționat de capacitatea genelor mutante de a iniția reacții imune. Diabetul zaharat tip 2 este deasemenea o patologie cu teren imunologic precar și prezintă multiple verigi patogenetice comune cu CGM. Scopul studiului a constat în analiza particularităților imuno-genetice la pacienți cu CGM și DZ tip 2 și determinarea gradului de corelare al ambelor patologii. În studiu au fost incluse 246 de pacienți cu CGM, dintre care 107 cu diabet zaharat tip 2 și 139 de pacienți cu CGM fără diabet zaharat. Studiul a fost efectuat pe material prospectiv în anii 2010-2014 în laboratorul științific Mamologie oncologică, IMSP Institutul Oncologic. Rezultatele studiului nostru au confirmat existența diverselor modificări în sistemul imun la pacienții cu CGM sub influența genei BRCA1 și asocierii DZ de tip 2.

**Cuvinte-cheie:** cancer mamar, diabet zaharat, reacții imune, BRCA 1

### **Summary. Correlation indices of cellular immunity and gene BRCA1 at patients with breast cancer and diabetes mellitus type 2**

Family history is a condition non-modifiable risk for breast cancer development and genetic manifesting some family associations. In terms etiopathogenetic breast cancer triggers a whole cascade of immunological changes that occur under the influence of factors triggers, a well-established genetic background. It is assumed that the increased risk of breast cancer in case of mutation in BRCA genes. Mutated gene is conditioned on the ability to initiate immune reactions. Type 2 diabetes is also a chronic pathology precarious immunological field and presents many common pathogenetic links with breast cancer. The purpose of this study was to analyze the immuno-genetic aspects in patients with breast cancer and type

2 diabetes determining the correlation of both pathologies. The study included 246 patients with CGM, of which 107 with type 2 diabetes and 139 non-diabetic patients with breast cancer. The study was conducted on prospective material for 2010-2014 in scientific laboratory Mammology Oncology, Oncological Institute. Our results confirmed the existence of various changes in the immune system in patients with BRCA1 gene breast cancer under the influence and involvement of T2DM.

**Key words:** breast cancer, diabetes, immune reactions, BRCA1

**Резюме. Корреляционные показатели клеточного иммунитета и мутации гена BRCA1 у пациенток с раком молочной железы и сахарным диабетом 2 типа**

Наследственная предрасположенность является немодифицируемым условием риска развития рака молочной железы и проявлением генетических семейных ассоциаций. Развитие рака молочной железы (РМЖ) запускает целый каскад иммунологических изменений, которые происходят под влиянием факторов триггеров и выраженном генетическом фоне. Предполагается, что развитие РМЖ при наличии мутации в генах BRCA, под воздействием мутации обуславливает способность инициировать различные иммунные реакции. Сахарный диабет 2 типа также является хронической патологией с выраженным многообразием иммунологических изменений и представляет много общих патогенетических связей с РМЖ. Целью данного исследования было проанализировать иммуно-генетические особенности у пациенток с РМЖ и сахарным диабетом 2 типа и определить корреляции между данными заболеваниями. В исследование были включены 246 пациенток с РМЖ, из которых 107 с РМЖ и сахарным диабетом 2 типа и 139, с РМЖ, но не страдающих диабетом. Исследование было проведено на проспективном материале с 2010-2014 гг. в отделении маммологии, Института Онкологии, г. Кишинева. Наши результаты подтвердили существование различных изменений в иммунной системе у больных с РМЖ с наличием гены BRCA1 под влиянием и при участии СД 2 типа.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, диабет, иммунные реакции, BRCA1

## Introducere

Din punct de vedere etiopatogenetic în cancerul glandei mamare se declanșează o cascadă întreagă de modificări imunologice, care apar sub influența unor factori triggeri, pe un fond genetic bine determinat. Actualmente este demonstrată relația dintre CGM și genele BRCA. Cele mai frecvente cazuri de CGM ereditare sunt asociate cu modificările genetice în gena BRCA1 (BReast CAncer 1) și, rareori, în gena BRCA2 (BReast CAncer 2), mai frecvent caracteristică pentru cancerul ovarian.

Funcția genei BRCA este să repare țesutul afectat și să asigure creșterea normală a celulelor la nivelul glandei mamare. Uneori aceste gene conțin mutații, care sunt transmise din generație în generație, ceea ce crește riscul apariției CGM. Mutațiile în genele BRCA1 și BRCA2 apar la maxim 10% din cazurile de cancer mamar. Paciente diagnosticate cu CGM și care au mutații la nivelul genelor BRCA1 și BRCA2 deseori au un istoric familial de cancer mamar, ovarian ori alta formă de cancer. Chiar și așa, majoritatea celor care dezvoltă cancer mamar nu au moștenit o genă modificată și nu au istoric familial cu această maladie, dar totuși au o mutație la nivelul acestor gene, o mutație nouă pe care o vor transmite urmașilor. Sunt studii, care prezintă că genelor BRCA li se atribuie un rol central în activitatea sistemului imun, care sunt mediate prin moleculele HLA, deoarece ele fixează fragmentele antigenice (peptidele) pentru a fi transportate limfocitelor.

Se cunoaște deja că și diabetul zaharat (DZ) poa-

te fi ereditar. Studiile familiale au evidențiat că rudele de gradul I ale unui pacient cu diabet zaharat de tip II au un risc de 3 ori mai mare de a face aceeași boală. Sunt cunoscute aproximativ 50 de gene presupus a fi implicate în determinismul DZ de tip 2. Dr. Frayling et al. au identificat în populația generală cele mai frecvente gene asociate cu creșterea în greutate. Ei au arătat că variațiile acestor gene sunt corelate cu indicele de masă corporală și cresc cu 70% riscul de obezitate. Gena cunoscută sub numele de FTO, reprezintă un factor de risc pentru DZ de tip 2. Ea a fost descoperită într-un studiu genetic extins efectuat în Marea Britanie. Dr. Bowden a afirmat că “descoperirea variantelor de gene a adus un plus de informații despre factorii de risc în diabet. Multe dintre actualele descoperiri au venit din cercetările care au combinat studiile individuale din multiple populații, acest fapt conferind o acuratețe crescută în depistarea genelor implicate în diabetul zaharat în populația generală”. Dr. Barosso și colegii săi au identificat recent o nouă variantă a genei MC4R, ce se află pe cromozomul 17 împreună cu genele BRCA și, care influențează cantitatea de grăsime, greutatea și riscul de obezitate. Această variantă poate coexista cu variantele genei FTO. Persoanele care prezintă variantele ambelor gene prezintă o greutate crescută în comparație cu persoanele care nu au aceste variante de gene. Dr. Espen Spangenburg și echipa sa de laborator sunt primii care au identificat că gena BRCA1 este exprimată nu doar în țesutul glandular mamar, dar și în mușchii scheletici și că aceasta joacă un rol-cheie în

mecanismele de depozitare de lipide, răspunsul la insulină, insulinoresistență și funcția mitocondrială în celulele musculaturii striate. Deasemenea, nu se știe încă dacă genele identificate până acum interacționează, crescând susceptibilitatea la obezitate și diabet zaharat.

În consecință, persoanelor cu genotipuri BRCA le este caracteristică o reacție specifică selectivă la diverși epitopi (grupările unui antigen care sunt recunoscute de organism ca "non-self") ai complexelor antigenice. Se presupune că riscul crescut de apariție a CGM în caz de mutație în genele BRCA este condiționat de capacitatea genelor mutante de a iniția reacții imune. Aceasta ar argumenta faptul că pacientele cu prezența mutațiilor în genele BRCA pot condiționa inițierea CGM și dezvoltă reacții imune insuficiente în controlul tumorii. Acest mecanism influențează negativ asupra reacțiilor de apărare ale sistemului imun și poate fi un factor important în dezvoltarea CGM.

**Scopul studiului** a constat în analiza particularităților imunogenetice la pacientele cu CGM și DZ tip 2 și determinarea gradului de corelare al ambelor patologii.

#### Material și metode de cercetare

În studiu au fost incluse 246 de paciente cu CGM, dintre care 107 cu diabet zaharat tip 2 (lotul I) și 139 de paciente cu CGM fără diabet zaharat (lotul II). Studiul a fost efectuat pe material prospectiv în anii 2010-2014 în laboratorul științific Mamologie oncologică, IMSP Institutul Oncologic.

La paciente s-au determinat următorii indici:

- indicii imunologici ai claselor limfocitare conform determinantelor clonale CD (precursoare), CD 4 (helperi), CD 5 (helper citotoxic), CD 8 (supresori), CD 16 (killeri naturali), CD 19 (B limfocite) în serul sanguin;
- frecvența mutației majore a genei BRCA1 5382insC.

Pentru determinarea genei BRCA1 s-a utilizat metoda de imunofenotipare, folosind testele de determinare a AND-ului BRCA1 5382 insC în regim de timp real (RQ-PCR).

Pentru obținerea rezultatelor au fost utilizate următoarele metode: metode de corelație, corelație factorială, calcularea ratelor, proporțiilor, valorilor medii etc.

#### Rezultate

În pofida studiilor cromozomiale aprofundate, până în prezent nu s-a descoperit nici un procedeu sau metodă, care să schimbe harta genetică a individului, ce este cauzată de variațiile populaționale ale genelor BRCA și ale DZ tip 2. Hiperproliferarea și diferențierea anormală (scăzută) a limfocitelor, anomaliile apoptozei în CGM asociat DZ tip 2 sunt rezultatul

unor secvențe imunologice complexe, această asocierie fiind considerată un statut autoimun mediat de celulele CD4, CD8 și CD16, a cărei complexitate este confirmată și de prezentul studiu.

Analiza factorială prin metoda ANOVA cu parametrizarea limitată prin  $\sigma$  a prezentat corelare dependentă pentru BRCA1 care s-au întâlnit în lotul pacientelor cu CGM și DZ tip 2 comparativ cu lotul 2 (fără diabet zaharat) ( $p=0,0043$ ). Aceasta înseamnă că există particularități genice BRCA1 specifice pentru pacienții cu CGM și DZ tip 2 în comparație cu pacientele cu CGM fără DZ tip 2, ce se confirmă și prin reprezentarea grafică de redistribuție a genei BRCA1 (tabelul 1, figura 1).

Tabelul 1

#### Indicele corelării factoriale a prezenței mutației genei BRCA1 la pacientele cu CGM și fără DZ tip 2

	Lotul I	Lotul II	P
BRCA1	r=0,93	r=0,34	P<0,005

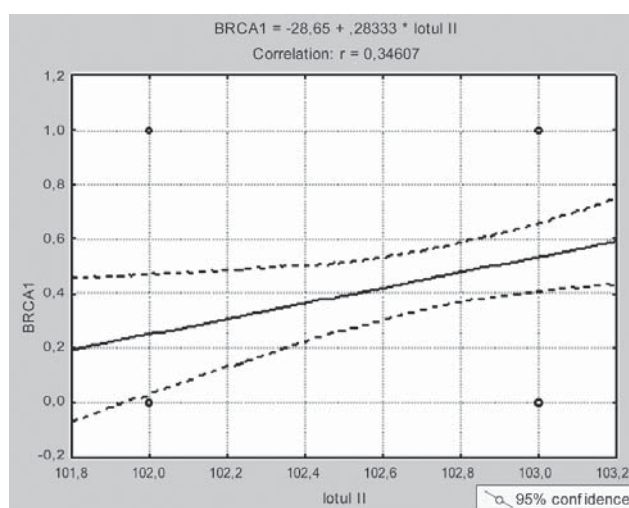
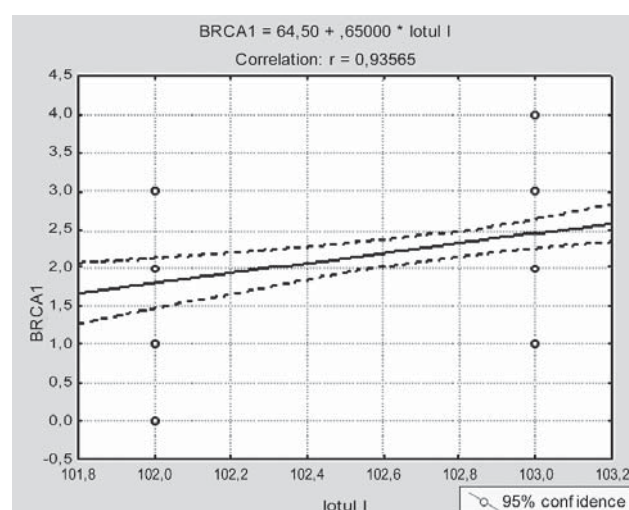


Figura 1. Reprezentarea grafică a corelării factoriale a prezenței mutației în gena BRCA1 la pacientele cu CGM

Cercetarea influenței genei BRCA 1 asupra statutului imun al pacienților a prezentat date valoroase în privința corelării valorilor cu indicii ce caracterizează activitatea imunocelulară. Cercetarea corelațională a genei BRCA1 și statutului imunocelular la pacienții cu CGM prin analiza factorială aplicând metoda ANOVA cu parametrizarea limitată prin  $\sigma$  a demonstrat că în cazul limfocitelor T CD3 lipsește o oarecare interdependență cu prezența mutației în gena BRCA1, indicele corelațional fiind nesemnificativ ( $r=0,45$ ;  $p>0,05$ ). Totodată, în cazul limfocitelor T CD4 s-au înregistrat diferențe între grupurile de pacienți. Dacă în cazul pacienților din lotul I s-au determinat corelări statistic semnificative între prezența mutației în gena BRCA1 și CD4 ( $p<0,005$ ), atunci pentru pacienții din lotul II nu s-au înregistrat corelări statistic semnificative ( $p>0,05$ ). Aceasta înseamnă că seturile genice care induc CGM în asociere cu DZ au proprietatea de a activa celulele CD4 și a lansa răspunsul imun incomplet, grăbind apoptoza celulară.

Examinarea rolului genei BRCA1 la formarea corelării a determinat că cele mai semnificative valori s-au prezentat în cazul valorilor glicemiei de peste 6,8 mmol/l, pe când seturile care nu conțineau gena BRCA1 au prezentat tendință corelativă cu valorile scăzute și normale ale limfocitelor T CD4, având efect relativ protectiv în evoluția CGM (tabelul 2, figura 2).

Tabelul 2

**Indicele corelării factoriale a prezenței mutației în gena BRCA1 cu valorile medii relative ale limfocitelor T CD4**

	Lotul I (CD4)	Lotul II (CD4)	P
BRCA1	$r=0,92$	-	$P<0,001$
BRCA1	-	$r=0,70$	$P<0,05$

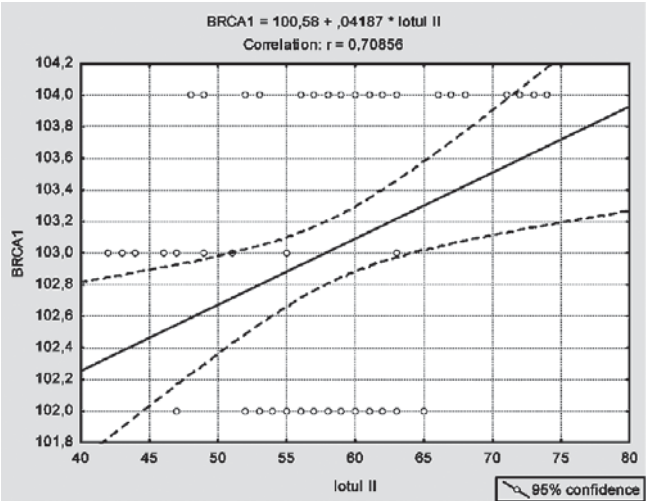
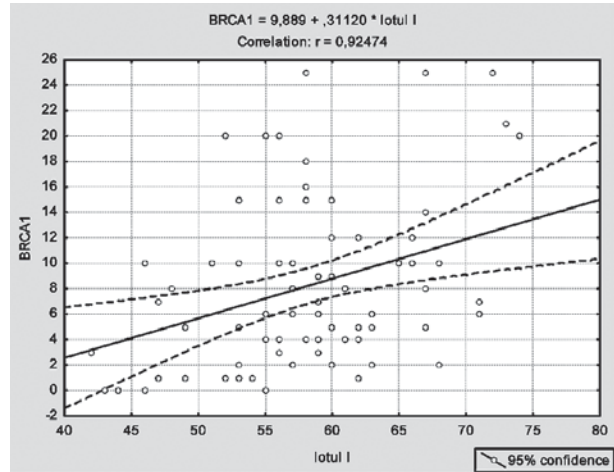


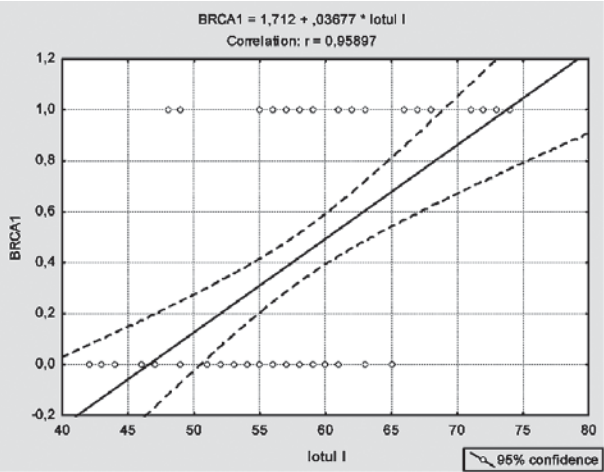
Figura 2. Reprezentarea grafică a corelării factoriale a prezenței mutației în gena BRCA1 cu valorile medii relative ale limfocitelor T CD4

În cazul limfocitelor T CD8 s-a înregistrat corelarea factorială cu prezența mutației în gena BRCA1, tendința principală fiind scăderea lor în serul sanguin, ce poate caracteriza scăderea diferențierii lor sau inducerea unei imunodeficiențe secundare (cum se întâmplă în cazul nu doar în CGM, dar, mai semnificativ, în DZ tip 2) (tabelul 3, figura 3).

Tabelul 3

**Indicele corelării factoriale a genei BRCA1 la pacienții cu CGM cu valorile medii relative ale limfocitelor T CD8.**

	Lotul I (CD8)	Lotul II (CD8)	P
BRCA1	$r=0,95$	-	$P<0,0001$
BRCA1	-	$r=0,62$	$P<0,05$





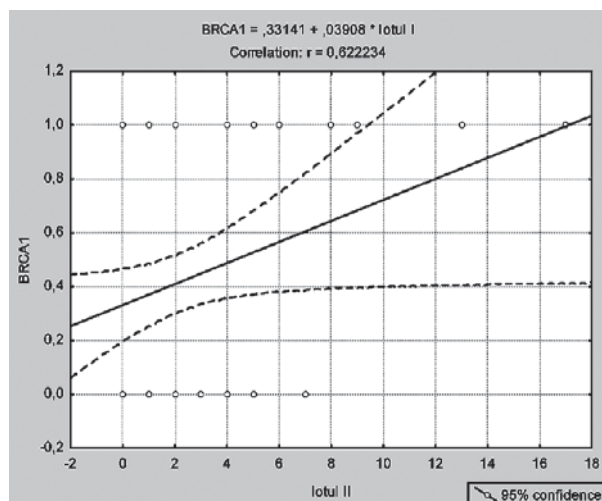


Figura 3. Reprezentarea grafică a corelării factoriale a genei BRCA1 la pacienții cu CGM cu valorile medii relative ale limfocitelor T CD8

Sumarul acestor modificări în concordanță cu loturile pacienților incluse în studiu este prezentat în tabelul 3. Concordanța acestor valori a fost confirmată prin semnificație statistică majoră pentru ambele loturi de pacienți cu valorile  $p < 0,0001$ .

Actualmente este bine conturat faptul că prezența mutației în gena BRCA1 reprezintă factor de risc pentru agresivitatea CGM, mai ales, în asocierea cu DZ tip 2. Analizând schimbările imunologice conform subtipurilor constatăm că în lotul pacienților cu CGM și DZ tip 2, mutația în gena BRCA1 determină scăderea limfocitelor T CD8, iar în lotul pacienților cu CGM fără DZ induce creșterea lor. Luând în considerare modificările pe care le induce mutația în gena BRCA1, putem concluziona că ea provoacă o imunosupresie generală cu micșorarea reacției imune. Posibil, că această diferență, înregistrată în cazul limfocitelor T CD8, este cauzată nu numai de influența BRCA1, dar și de acțiunea concomitentă stimulatoră a limfocitelor T CD4, asupra cărora DZ acționează în mod absolut invers decât asupra limfocitelor T CD8. Astfel, proliferarea programată indusă de către hiperglicemii și genele BRCA1 ai limfocitelor T CD4 în cadrul CGM va atenua creșterea și maturizarea limfocitelor T CD8, iar în cadrul CGM fără DZ tip 2 induce proliferarea limfocitelor T CD8 cu suprimarea, posibil secundară, a limfocitelor T CD4.

Pentru caracteristica generală a statusului imunocelular în cadrul CGM este necesar de analizat corelarea genei BRCA1 cu valorile limfocitelor T CD16 (tabelul 4, figura 4).

Tabelul 4

**Indicele corelării factoriale a prezenței mutației în gena BRCA1 cu valorile medii relative ale limfocitelor T CD16**

	Lotul I (CD16)	Lotul II (CD16)	P
BRCA1	$r=0,99$	-	$P<0,0001$
BRCA1	-	$r=0,92$	$P<0,005$

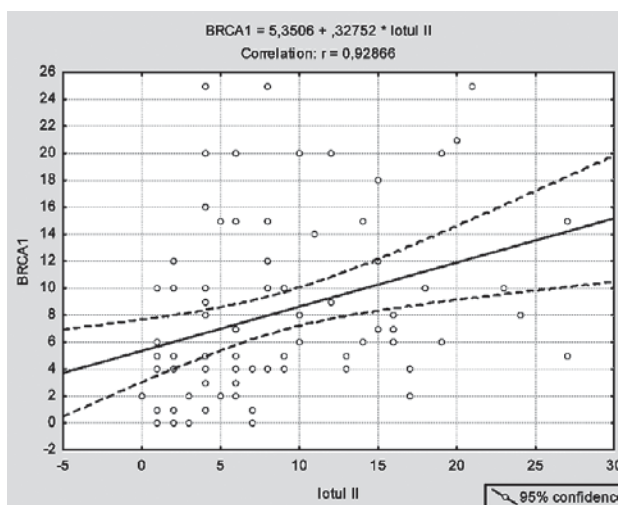
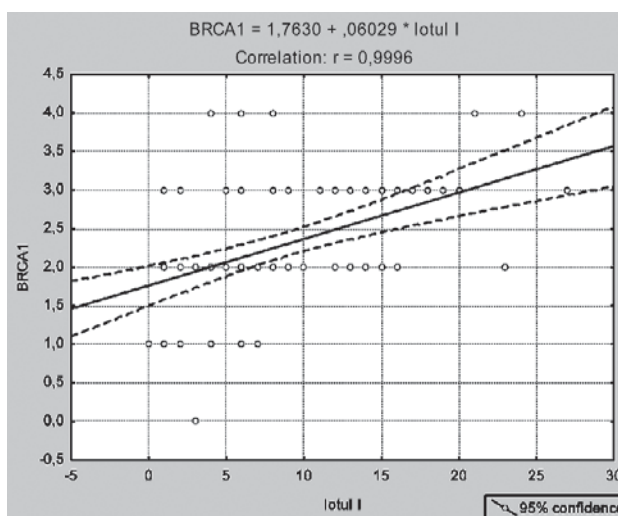


Figura 4. Reprezentarea grafică a corelării factoriale a genei BRCA1 cu valorile medii relative ale limfocitelor CD16

Analiza factorială prin metoda ANOVA cu parametrizarea limitată prin  $\sigma$  a genei BRCA1 în CGM în funcție de nivelul limfocitelor T CD16 a confirmat încă odată că gena BRCA1 determină evoluția gravă a bolii și inhibă proliferarea limfocitară CD16 ( $p < 0,0001$  pentru lotul I și  $p < 0,005$  pentru lotul II), ceea ce denotă o inhibiție a accelerării imunității anti-tumorale la pacienții cu variantele clinice severe ale bolii (tabelul 4).

Din datele prezentate putem concluziona că gena BRCA1 determină hipoactivarea limfocitelor CD16 cu inhibiția reacției citotoxice specifice antitumorale cu preponderență în cazul pacienților cu CGM în asocierie cu DZ tip 2. Prezența mutației în gena BRCA1 deseori se asociază cu evoluția severă a DZ agravând și mai mult evoluția clinică a bolii prin combinarea unui component autoimun sever.

### Concluzii

Rezultatele studiului nostru au confirmat existența diverselor modificări în sistemul imun la paciențele cu CGM sub influența genei BRCA1 și asocierii DZ de tip 2.

1. În baza rezultatelor obținute în ceea ce privește rolul genei BRCA1 și influența ei asupra procesului imunopatologic în CGM, am constatat că organismul uman are o anumită susceptibilitate genetică, și probabil, la intervenția unui factor de mediu ar fi capabil să declanșeze un mecanism imun de diferită intensitate, manifestat printr-o disbalanță a celulelor imunocompetente (CD4, CD8 și CD16), mecanisme ce stau la baza imunității antitumorale.

2. Astfel, pentru paciențele cu CGM au fost caracteristice unele modificări imunopatologice conjugate cu gena BRCA1, care au fost, probabil, agravate de influența DZ tip 2. Ultimul, având o influență majoră asupra imunodepresiei celulare, care a avut un caracter general nespecific, însă cu repercusiuni manifeste asupra imunității antitumorale CD16 cu scăderea severă a numărului lor în sângele periferic.

3. Ipoteza etiopatogenetică se rezumă la prezența unei predispoziții genetice cât pentru CGM, atât și pentru DZ tip 2, iar intervenția unui factor de mediu este capabilă să declanșeze boala, care mai apoi este autoîntreținută prin mecanisme imunopatologice.

### Bibliografie

- Antoniou A.C., Easton D.F. Polygenic inheritance of breast cancer: Implications for design of association studies. *Genet Epidemiol.* 2009; 25: p.190–202.
- Antoniou A.C. et al. Evidence for further breast cancer susceptibility genes in addition to BRCA1 and BRCA2 in a population-based study. *Genet. Epidemiol.* 2006; 21: p.1–18.
- Barnes D. et al. Evaluation of association methods for analysing modifiers of disease risk in carriers of high risk mutations. *Genet. Epidemiol.* 2012; 36: p.274–291.
- Barroso I., Langenberg C., Sharp S.J. et al. Medical Research Council Epidemiology Unit, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom. Gene-lifestyle interaction and type 2 diabetes: the EPIC interact case-cohort study. 2014;11;5:e1001647.
- Bowden D.W., Cox A.J., Hugenschmidt C.E., Raffield L.M., Langefeld C.D., Freedman B.I., Williamson J.D., Hsu F.C. Heritability and genetic association analysis of cognition in the Diabetes Heart Study. *Neurobiol Aging.* 2014 Aug;35(8): p.103–112.
- Bowden D.W., Cox A.J. Diabetes: Unravelling the enigma of T2DM. *Nat Rev Endocrinol.* 2013 Nov;9(11): p.632–643.
- Bowden D.W., Ng M.C. Is genetic testing of value in predicting and treating obesity? *N C Med J.* 2013 Nov-Dec;74(6): p.530–533.
- Bryant H. Reconsidering the public health approach to breast cancer screening. *Cancer Forum.* 2014; 38(3) p. 202–206.
- Diabetes Genetics Replication And Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium; Asian Genetic Epidemiology Network Type 2 Diabetes (AGEN-T2D) Consortium; South Asian Type 2 Diabetes (SAT2D) Consortium; Type 2 Diabetes Genetic Exploration by Next-generation sequencing in multi-Ethnic Samples (T2D-GENES) Consortium, Nat Genet. Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility 2014 Mar;46(3): p.234–244.
- Frayling I., Ward R. Should we consider introducing systematic screening for Lynch Syndrome? *Cancer Forum.* 2014; 38(3): p.229–232.
- Hernandez L. et al. Genomic and mutational profiling of ductal carcinomas in situ and matched adjacent invasive breast cancers reveals intra-tumour genetic heterogeneity and clonal selection. *J. Pathol.* 2012; 227: p.42–52.
- Lann D., LeRoith D. The role of endocrine insulin-like growth factor-I and insulin in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2008;13: p.371–379.
- Larsson S.C., Mantzoros C.S., Wolk A. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer.* 2007;121: p.856–862.
- Narod S.A. BRCA mutations in the management of breast cancer: the state of the art. *Nat Rev Clin Oncol* 2010, 7(12): p.702–707.
- Roder D. Breast Cancer Screening: Update in the Australian context. *Cancer Forum.* 2014; 38(3): p.197–198.
- Snape K. et al. Predisposition gene identification in common cancers by exome sequencing: insights from familial breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 134: p. 429–433.
- Spangenburg E. E., Jackson, E.-K. Gidlund, J. Norrbom, A. P. Valencia, D. M. Thomson, R. A. Schuh, P. D. Neuffer, BRCA1 is a Novel Regulator of Metabolic Function in Skeletal Muscle. *The Journal of Lipid Research*, 2014.
- Turnbull C, et al. Genome-wide association study identifies five new breast cancer susceptibility loci. *Nat. Genet.* 2010;42: p.504–507.
- Turnbull C., Rahman N. Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9:321–345.
- Xue F., Michels K.B. Diabetes, metabolic syndrome, and breast cancer: a review of the current evidence. *Am J Clin Nutr.* 2007;86: p.823–835.